

도졸라마이드-티몰롤과 라타노프로스트가 가토 방수의 산화환원계에 미치는 영향

박상우 · 이승현 · 문귀형

전남대학교 의과대학 안과학교실

목적: Dorzolamide-Timolol과 Latanoprost가 가토 방수의 산화환원계에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 가토 20마리 40안을 10마리씩 두 군으로 나누어 첫째군에서는 우안에 Dorzolamide-Timolol을 6시간 간격으로 점안하고 좌안은 대조군으로 하였다. 둘째군에서는 Latanoprost를 같은 방법으로 점안하고 4주 후 방수를 채취하여 superoxide dismutase (SOD) 활성도와 ascorbic acid 농도를 각각 측정하였다.

결과: 첫째군에서 우안과 좌안의 SOD 활성도는 각각 15.7%, 19.3% ($p=0.273$), ascorbic acid 농도는 1.4 pM, 1.8 pM ($p=0.197$)이었고, 둘째군에서 우안과 좌안의 SOD 활성도는 각각 23.9%, 26.1% ($p=0.465$), ascorbic acid 농도는 1.4 pM, 1.7 pM ($p=0.144$)로 통계학적 차이는 보이지 않았다.

결론: Dorzolamide-timolol과 Latanoprost 점안은 토끼 방수의 SOD 활성도와 ascorbic acid 농도에 의미 있는 영향을 주지 않았다. <대한안과학회지 2009;50(3):424-428>

녹내장은 서서히 진행되는 시신경병증으로 안저검사상 특징적인 시신경유두의 변화와 이에 상응하는 시야결손을 보이는 질환으로 아직까지 병인은 명확히 밝혀져 있지 않다.^{1,2} Sacca et al³은 원발성 개방각녹내장에서 섬유주 세포 내 DNA의 산화적 손상에 의해 섬유주가 변성되어 방수 유출이 제한됨에 따라 안압이 상승되어 일련의 병리적인 단계적 반응이 일어난다고 하였다. 또한, Zhou et al⁴은 산화적 손상에 의해 섬유주세포와 fibronectin, laminin, collagen 등과 같은 세포외기질과의 유착이 감소하여 섬유주세포가 소실되고 섬유주의 세포골격구조가 재배열됨에 따라 안정성이 파괴되어 이로 인해 병리적인 과정이 진행된다고 보고하였다. 이러한 산화적 손상은 초과산화물(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2) 그리고 수산화기($\cdot OH$) 등의 다양한 활성 산소종에 의해 매개되며, 최종적으로 생성된 산소유리기는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) 등과 같은 내인성 항산화효소들과 비타민 C, E와 같은 자유기 탐식물질들에 의해 제거된다.⁵⁻¹² 결국 산화적 손상의 정도는 산소 유리기와 항산화제간의 균형에 의하여 결정되는데 녹

내장 환자의 방수 내 산화환원계는 녹내장이 없는 백내장 환자의 산화환원계와 차이가 있는 것으로 알려져 있다.^{13,14} Izzotti et al¹⁵은 산화적 손상에 의한 섬유주의 변성은 원발성 개방각녹내장이 발생하는 데 핵심적인 역할을 하고 원발성 개방각녹내장 환자들은 정상인과 비교하여 방수 내 SOD와 GPx 활성도에 차이가 있다고 발표하였으며, Beit-Yannai et al¹⁶은 선천적으로 유도된 6마리 토끼의 방수에서 정상대조군에 비해 ascorbic acid와 uric acid가 감소되어 있는 것을 발견하여 보고한 바 있으며 이는 만성적인 산화적 손상에 의한다고 하였다.

녹내장에서 흔히 사용되는 acetazolamide, pilocarpine, β -blocker 등의 안압하강제의 점안은 방수성분을 변화시키고 변화된 방수는 녹내장 수술 후에 여과포로 유출된 후 수술 부위의 창상치유에 관여하는 섬유모세포등의 조직들에 영향을 미칠 수 있다는 여러 보고가 있다.¹⁷⁻²⁰

이와 같이 녹내장 환자의 방수 내에 SOD 활성도와 ascorbic acid 농도는 정상안과 차이가 있고 녹내장의 병리적 변화와 방수 내의 SOD 활성도와 ascorbic acid 농도가 관련이 있다는 발표들이 있다.^{15,16} 따라서 저자들은 녹내장 환자들에게 흔히 사용되는 Dorzolamide-Timolol과 Latanoprost가 토끼의 방수 내 SOD활성도와 ascorbic acid 농도에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 하였다.

대상과 방법

실험동물은 2,000~2,500 g의 Newzealand white albino

■ 접수 일: 2008년 5월 28일 ■ 심사통과일: 2008년 11월 4일

■ 통신저자: 박 상 우

광주시 동구 학동 8

전남대학교병원 안과

Tel: 062-220-6743, Fax: 062-227-1642

E-mail: exo70@naver.com

* 본 논문의 요지는 2008년 대한안과학회 제99회 춘계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

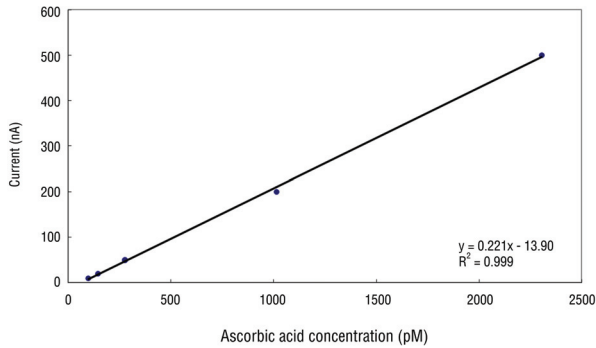


Figure 1. Standard curve for ascorbic acid assay.

rabbit 20마리를 사용하였고 실험 4주 전부터 동일한 실험실에서 일정한 사료로 사육하였다. 20마리의 백색가토를 10마리씩 각각 두 군으로 나누어 1군에서는 우안에 Dorzolamide-Timolol (Cosopt)을 하루에 4회씩 4주간 점안하고 좌안은 대조군으로 하였다. 2군에서는 우안에 Latanoprost (Xalatan)을 동일한 방법으로 점안하고 좌안은 대조군으로 하였다. Ketamine hydrochloride (50 mg/kg)과 xylazine HCL (10 mg/kg)을 근육 주사하여 마취한 후 수술현미경을 이용하여 홍채와 각막내피세포에 손상이나 출혈이 발생하지 않도록 주의하였고 전방이 허탈되지 않도록 하면서 가능한 빠른 시간 안에 방수 0.1~0.2 ml을 채취하였다. 방수 채취 시 투베르쿨린 주사기와 30게이지 주사침을 이용하였고 채취한 방수는 Eppendorf tube에 담아 즉시 4°C에 보관하여 1시간 이내에 방수분석을 시작하였다.

방수 내 SOD 활성도의 측정을 위해 SOD assay kit-WST (Dozindo Molecular Technologies, Inc., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 백색가토의 방수를 kit 내 시약에 반응시킨 후 20분간 보온 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 xanthine oxidase의 억제를 통한 SOD 활성도를 구하였으며 3회 반복 측정하여 평균값으로 하였다. 방수 내 ascorbic acid 측정을 위해 0.6 M perchloric acid와 1 mM EDTA 혼합용액 100 µl에 백색가토의 방수를 동량 혼합한 후 4°C에서 12,000G로 30분간 원심분리하고 상층액을 100 µl 채취해서 1차 증류수 400 µl로 희석하였다. 막여과기로 여과한 후 High pressure liquid chromatography (HPLC) 기기에 해밀턴 주사기로 주입하였다. Ascorbic acid를 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, 10 µM, 25 µM 농도를 기기 내로 주입하였을 때의 검출영역을 구한 후(Fig. 1) 이를 기준으로 하여 백색가토의 방수를 20 µl씩 주입하면서 각각의 농도를 구하였다. Pump (LC-10Aim, Shimadzu, Japan)와 injector (SIL-10i, Shimadzu, Japan), detector (HPLC-coularry, Shimadzu, Japan)로 이루어진 HPCL 시스템을 사용하여 분석하였고 2회 반복하여 평균으로 하였으며, 단백질량은

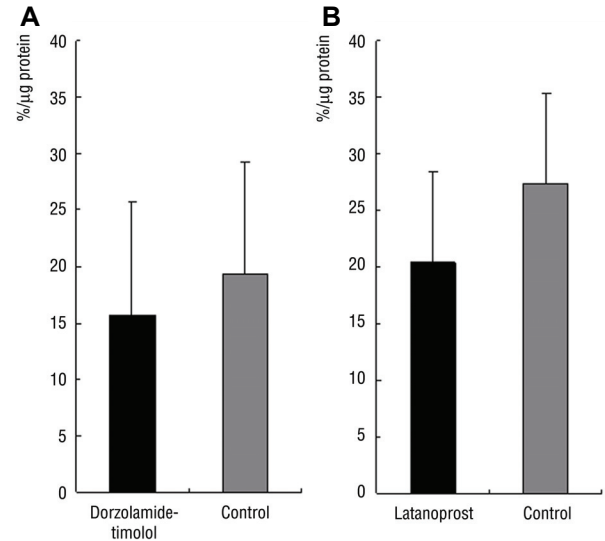


Figure 2. (A, B) Superoxide dismutase (SOD) activities in the aqueous humor of both eyes. (A) After instillation of Dorzolamide-Timolol (black bar) and (B) Latanoprost (black bar) in the right eye, respectively. There were no significant differences between both eyes.

BSA를 이용하였다.

통계분석은 SPSS 14.0 프로그램을 사용하였고 표본이 정규분포를 따르지 않으므로 비모수검정인 Wilcoxon-signed rank test로 검정하였다.

결 과

우안에 Dorzolamide-Timolol을 점안한 백색가토 10마리의 방수 내 SOD 활성도와 ascorbic acid 농도는 각각 $15.72 \pm 12.33\%/\mu\text{g protein}$, $2.67 \pm 0.50 \text{ pM}/\mu\text{g protein}$ 이었고 안약을 점안하지 않은 대조군인 좌안의 방수 내 SOD 활성도와 ascorbic acid 농도는 각각 $19.31 \pm 8.08\%/\mu\text{g protein}$ ($p=0.27$), $2.61 \pm 0.35 \text{ pM}/\mu\text{g protein}$ ($p=0.47$)이었다(Fig. 2).

우안에 Latanoprost를 점안한 백색가토 10마리의 방수 내 SOD 활성도와 ascorbic acid 농도는 각각 $22.28 \pm 7.78\%/\mu\text{g protein}$, $2.26 \pm 0.30 \text{ pM}/\mu\text{g protein}$ 이었고 안약을 점안하지 않은 대조군인 좌안의 방수 내 SOD 활성도와 ascorbic acid 농도는 각각 $27.59 \pm 8.35\%/\mu\text{g protein}$ ($p=0.14$), $2.09 \pm 0.90 \text{ pM}/\mu\text{g protein}$ ($p=0.89$)이었다(Fig. 3).

고 찰

최근 녹내장 환자의 방수 내 산화환원계에 대하여 많은

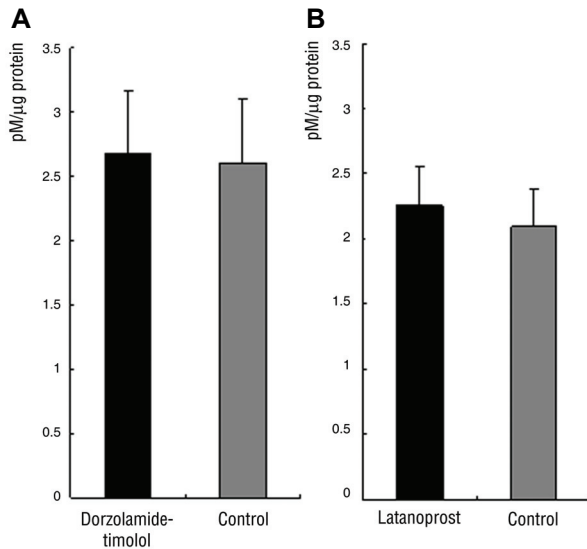


Figure 3. (A, B) Ascorbic acid concentration in the aqueous humor of both eyes. (A) After instillation of Dorzolamide-Timolol (black bar) and (B) Latanoprost (black bar) in the right eye, respectively. There were no significant differences between both eyes.

관심이 모아지고 있으며 산화적 손상이 진행되는 일련의 과정에서 최종적으로 생성되는 산소유리기를 제거하는데 SOD와 ascorbic acid는 중요한 역할을 한다.²¹⁻²⁴ SOD는 산소 유리기에 의한 지방산화, 백내장의 진행을 억제시키며, 망막에서의 광산화 반응에 의한 인지질층의 변성을 막아주는 대표적인 물질로 알려져 있다.²⁵ Ferreira et al²⁶은 원발성개방각녹내장 환자들은 정상인에 비해 방수 내 SOD와 GPx의 활성도가 증가되어 있다고 발표하였고 이는 원발성개방각녹내장 환자에서 증가된 산화적 손상인자들을 제거하기 위한 보상기전으로 항산화 메커니즘이 활성화되어 SOD와 GPx 등과 같은 항산화제가 증가한다고 하였다.

Ascorbic acid가 방수 내에서 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀지지 않았지만 주로 산화방지제로 작용하여 광선에 의하여 유발된 자유기(free radical)로부터 안조직을 보호하고 섬유주 세포의 Fibronectin과 Laminin 생산을 조절하고 녹내장 수술의 주된 실패원인으로 거론되는 섬유화 조직의 증식을 억제시키는 작용을 하며, 자외선을 흡수하여 이에 의한 망막과 수정체의 손상을 막아주고 안내염증 시 나오는 산소자유기로부터 안조직을 보호하는 기능을 가지며, 염증 시 산화성파괴로부터 보호하는 역할을 한다고 추측된다.^{27-32,39} Lee et al²³은 대부분의 개방각녹내장 환자의 방수 내 ascorbic acid 농도는 정상인에 비하여 감소되어 있지 않고 일부 원발성개방각녹내장 환자에서 ascorbic acid 농도 차이가 나타나는 이유는 모양체돌기의 대사 활성도의 영향이 아니고 섬유주손상에

의한 영향이라고 하였다. 그러나 Lam et al³³은 유전적으로 우안(buphthalmos)을 가진 가토의 방수분석을 통해 ascorbic acid 농도의 감소는 우안의 녹내장성 병리적 변화와 관련이 있다고 발표하였다. 이와 관련하여 Fox et al³⁴은 유전적으로 우안을 가진 가토에서 방수의 ascorbic acid의 농도가 매우 낮으며, 안압의 증가와 ascorbic acid의 농도는 역으로 비례해서 나타난다고 하였다. 또한 녹내장 환자의 방수 내 ascorbic acid 농도에 대하여 Lam et al³⁵은 신생혈관성 녹내장에서 감소한다고 하였고, Fong et al³⁶은 녹내장에서 ascorbic acid 농도는 높거나 낮을 수 있다고 보고하였다. 이와 같이 방수 내 항산화제의 변화와 원발성개방각녹내장의 병인을 서로 연결지어 보려는 노력들이 집중되어 왔고 녹내장환자들에게 장기간 사용하는 안압하강제가 방수 내 성분변화에 영향을 주는지에 대한 연구도 있었다. Becker¹⁷는 acetazolamide가 방수 내의 ascorbic acid의 농도를 약 20% 증가시킨다고 하였고 Bar-Ilan et al³⁷은 carbonic anhydrase inhibitor의 국소점안은 후방수 ascorbic acid 농도를 1.37~1.7배 가량 증가시킨다고 하였다. Krohne³⁸은 pilocarpine을 개와 고양이에게 국소점안 한 결과 개에서는 방수단백의 증가가 있었고 고양이에서는 유의한 차이가 없었다고 하였다.

본 연구에서 저자들은 녹내장 환자들에게 흔히 사용되는 Dorzolamide-Timolol과 Latanoprost가 토끼의 방수 내 Ascorbic acid 농도와 Superoxidase dismutase 활성도에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 하였다. Kim et al³⁹은 가토에서 방수와 유리체 내의 Ascorbic acid 정량분석을 통해 양안에서 Ascorbic acid 농도 차는 비교적 적고 개체간의 차이는 많았다고 발표한 바 있어서 본 연구에서도 동일한 개체의 반대쪽 눈을 대조군으로 하였으며, 연구 결과 Dorzolamide-Timolol을 점안한 군($p=0.27$)과 Latanoprost를 점안한 군($p=0.14$) 모두에서 SOD 활성도는 정도의 감소가 있었으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

본 연구의 제한점으로는 첫째, 방수 내 산화손상에 대한 방어기전은 토끼와 사람에서 차이가 있을 수 있고 토끼의 양 눈 사이에는 communicating artery가 존재하기 때문에 점안한 반대쪽 눈의 약물농도가 사람에 비해 높을 수 있다.⁴⁰ 둘째, 본 실험에서는 정상안에서 Dorzolamide-Timolol과 Latanoprost가 토끼의 방수 내 SOD 활성도와 ascorbic acid 농도에 어떠한 영향을 주는지 알아 본 연구이므로 녹내장안과는 차이가 있을 수 있다. 셋째, 저자들은 Dorzolamide-Timolol과 Latanoprost를 한 달간 점안한 후 방수분석을 하였지만 실제 녹내장 환자들은 장기간 약물투여를 하기 때문에 사람을 대상으로 한 장기적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Gupta N, Weinreb RN. New definition of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 1997;8:38-41.
- Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, et al. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:774-86.
- Sacca SC, Pascotto A, Camicione P, et al. Oxidative DNA damage in human trabecular meshwork. *Arch Ophthalmol* 2005;123:458-63.
- Zhou L, Li Y, Yue BY. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J Cell Physiol* 1999;180:182-9.
- Rose RC, Richer SP, Bode AM. Ocular oxidants and antioxidant protection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:397-407.
- Babizhayev MA, Bunin AY. Lipid peroxidation in open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol* 1989;67:371-7.
- Luthra A, Gupta N, Kaufman PL, et al. Oxidative injury by peroxynitrite in neural and vascular tissue of the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 2005;80:43-9.
- Izzotti A, Sacca SC, Cartiglia C, De Flora S. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients. *Am J Med* 2003;114:638-46.
- Levin LA, Clark JA, Johns LK. Effect of lipid peroxidation inhibition on retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:2744-9.
- Neufeld AH. Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999;43:129-35.
- Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione reductase, and glutathione peroxidase after radiation of guinea pigs. *Biochem Med* 1984;31:217-27.
- Richer SP, Rose RC. Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV and hydrogen peroxide. *Vision Res* 1998;38:2881-8.
- Valencia E, Hardy G, Marin A. Glutathione: nutritional and pharmacologic viewpoints: Part VI. *Nutrition* 2002;18:291-2.
- Lee IS, Yu YS, Kim DM, et al. Detection of specific proteins in the aqueous humor in primary open angle glaucoma. *Korean J Ophthalmol* 1990;4:1-4.
- Izzotti A, Bagnis A, Sacca SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research* 2006;612:105-14.
- Beit-Yannai E, Trembovler V, Solomon AS. Decrease in reducing power of aqueous humor originating from glaucomatous rabbits. *Eye* 2007;21:658-64.
- Becker B. Chemical composition of human aqueous humor. *Arch Ophthalmol* 1957;57:793-800.
- Mori M, Araie M, Sakurai M, et al. Effect of pilocarpine and tpicamide on blood-aqueous barrier permeability in man. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:416-23.
- Richter CU, Shingleton BJ, Bellows AR, et al. The development of encapsulated filtering blebs. *Ophthalmology* 1988;95:1163-8.
- Herschler J, Claflin AJ, Fiorentino G. The effect of aqueous humor on the growth of subconjunctival fibroblasts in tissue culture and its implications for glaucoma surgery. *Am J Ophthalmol* 1980;89:245-9.
- De La Paz MA, Epstein DL. Effect of age on superoxide dismutase activity of human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1849-53.
- Greenlund LJ, Deckwerth TL, Johnson EM Jr. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 1995;14:303-15.
- Lee P, Lam KW, Lai M. Aqueous humor ascorbate concentration and open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1977;95:308-10.
- Yildirim O, Ates NA, Ercan B, et al. Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma. *Eye* 2005;19:580-3.
- Rao Na, Thaete LG, Delmage JM, Sevanian A. Superoxide dismutase in ocular structure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:1778-81.
- Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, et al. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol* 2004;137:62-9.
- Reiss GR, Wernss PG, Zollman PE, Brubaker RF. Ascorbic acid levels in the aqueous humor of nocturnal and diurnal mammals. *Arch Ophthalmol* 1986;104:735-55.
- Williams RN, Paterson CA. A protective role for ascorbic acid during inflammatory episodes in the eye. *Exp Eye Res* 1986;42:211-8.
- Moses RA, Hort WM Jr. Adler's physiology of the eye, 8th ed. St Louis: CV Mosby 1987:212-22.
- Yue BY, Higginbotham EJ, Chang IL. Ascorbic acid modulates the production of fibronectin and laminin by cells from on eye trabecular meshwork. *Exp Cell Res* 1990;187:65-8.
- Jampel HD. Ascorbic acid is cytotoxic to dividing human Tenon's capsule fibroblast: a possible contributing factor in glaucoma filtration surgery success. *Arch Ophthalmol* 1990;108:1323-5.
- Becker B. Ascorbate transfer in guinea pig eyes. *Invest Ophthalmol* 1967;6:410-5.
- Lam KW, Lee P, Fox R. Aqueous ascorbate concentration in hereditary buphthalmic rabbits. *Arch Ophthalmol* 1976;94:1565-7.
- Fox RR, Lam KW, Lewen R, Lee P. Ascorbate concentration in tissues from normal and buphthalmic rabbits. *J Heredity* 1982;73:109-11.
- Lam KW, Lee PF. Analysis of ascorbate concentration in the aqueous humor by high pressure liquid chromatography. *Invest Ophthalmol* 1975;14:947-50.
- Fong D, Etzel K, Lee PF, et al. Factors affecting ascorbate oxidation in aqueous humor. *Curr Eye Res* 1987;6:357-61.
- Bar-Ilan A, Pesah NI, Maren TH. The effects of carbonic anhydrase inhibitors on aqueous humor dynamics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:1198-205.
- Krohne SG. Effect of topically applied 2% pilocarpine and 0.25% demecarium bromide on blood-aqueous barrier permeability in dogs. *Am J Vet Res* 1994;55:1729-33.
- Kim DH, Kwak HW, Kim JM. Ascorbic acid determination in aqueous and vitreous humor of the rabbit. *J Korean Ophthalmol Soc* 1997;38:865-9.
- Forster S, Mead A, Sears M. An interophthalmic communicating artery as explanation for the consensual irritative response of the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:161-5.

=ABSTRACT=

The Effect of Dorzolamide-Timolol and Latanoprost on Redox Cycle in Aqueous Humor of Rabbit

Sang Woo Park, MD, Seung Hyun Lee, MD, Gui Hyeong Mun, MD

Department of Ophthalmology, Chonnam National University Medical School & Hospital, Gwangju, Korea

Purpose: To evaluate the effect of dorzolamide-timolol and latanoprost on redox cycle of superoxide dismutase (SOD) and ascorbic acid in the aqueous humor of the rabbit.

Methods: Group 1 (20 eyes of 10 rabbits) was instilled with dorzolamide-timolol in the right eye and Group 2 (20 eyes of 10 rabbits) was instilled with latanoprost in the same manner. Four weeks after instillation, SOD activity and ascorbic acid concentration were analyzed.

Results: In Group 1, SOD activity and ascorbic acid concentration of the right eye and left eye were 15.7% and 19.3% ($p=0.27$), 2.7 pM and 2.6 pM ($p=0.47$), respectively. In Group 2, SOD activity and ascorbic acid concentration of the right and left eye were 22.3% and 27.6% ($p=0.14$), 2.3 pM and 2.1 pM ($p=0.89$), respectively.

Conclusions: There was no significant difference of SOD activity and ascorbic acid concentration between both eyes in Group 1 and 2.

J Korean Ophthalmol Soc 2009;50(3):424-428

Key Words: Ascorbic acid, Dorzolamide-timolol, Latanoprost, Superoxide dismutase

Address reprint requests to **Sang-Woo Park, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Chonnam National University Medical School

#8 Hak-dong, Dong-gu, Gwangju 501-757, Korea

Tel: 82-62-220-6743, Fax: 82-62-227-1642, E-mail: exo70@naver.com